

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA AMBIENTAL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL**

HÉLEN CAROLINE ZONTA ABILHÔA

**PRODUÇÃO DE ÓLEOS MICROBIANOS POR LEVEDURAS DO
GÊNERO *Saccharomyces spp.***

**FRANCISCO BELTRÃO
2018**

HÉLEN CAROLINE ZONTA ABILHÔA

**PRODUÇÃO DE ÓLEOS MICROBIANOS POR LEVEDURAS DO
GÊNERO *Saccharomyces spp.***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Ambiental, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Francisco Beltrão.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Cláudia E. Castro
Bravo

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Ivane Benedetti
Tonial

Francisco Beltrão, PR
2018



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Francisco Beltrão
Curso de Engenharia Ambiental



TERMO DE APROVAÇÃO
Trabalho de Conclusão de Curso – TCC2

**Produção de óleos microbianos por leveduras do gênero
*Saccharomyces spp.***

por

Hélen Caroline Zonta Abilhôa

Trabalho de Conclusão de Curso 2 apresentado às **10:00 horas, do dia 27 de Novembro de 2018**, como requisito parcial para obtenção do título de **Engenheira Ambiental**, e para aprovação da disciplina Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso de Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, *Campus Francisco Beltrão*. A candidata foi arguida pela Banca Avaliadora composta pelas professoras abaixo assinadas. Após deliberação, a Banca Avaliadora considerou o trabalho **APROVADO**.

Banca Avaliadora:

Profª Drª. Claudia Eugênia Castro Bravo
Presidente da Banca
Professora Orientadora

Profª. Drª. Ivane Benedetti Tonial
Membro da Banca
Professora co-orientadora

Profª. Drª. Ellen Porto Pinto
Membro da Banca
Professora convidada

Profª. Drª. Denise Andréia Szymczak
Professora responsável pelo TCC Coordenadora
do Curso de Engenharia Ambiental

"A cópia original encontra-se assinada na coordenação de Engenharia Ambiental."

“Aos amigos, família, colegas e professores, mas principalmente aos meus pais Lourdes e Armando “In Memoriam”, e minha “mãe-científica” prof^a Cláudia, que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até aqui.”

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

A minha mãe Lourdes por seu amor incondicional e apoio nas horas difíceis. Por não me deixar desistir mesmo quando tudo parecia sem sentido. E por ser meu exemplo de honestidade e de ser humano.

A minha orientadora, professora Dr^a Cláudia E. C. Bravo, que com o passar do tempo tornou-se muito mais que uma simples professora, tornou-se amiga e muitas vezes mãe, agradeço não somente por ter aceito me orientar, mas por todo seu incentivo, sua confiança, pelos ensinamentos a mim transmitidos, por sua imensa paciência para comigo, por seus inúmeros conselhos, sua grandiosa ajuda e por sempre propiciar a mim, a oportunidade de aprender mais a cada dia.

A professora Dr^a Ivane Benedetti Tonial, minha co-orientadora, por seu carinho, sua imensa ajuda, atenção e colaboração, que foram imprescindíveis para realização deste trabalho.

À professora Dr^a Ellen Porto Pinto, membro da banca, por toda sua contribuição, atenção e carinho.

À Aline Berlanda pela parceria nos experimentos e imensurável ajuda com as análises durante o período de experimentação, e por se tornado uma amiga.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná quero deixar uma palavra de gratidão por ter me recebido de braços abertos no curso de Engenharia Ambiental.

As amizades que construí durante os anos de graduação e com quem compartilhei inúmeros momentos felizes: Tamires, Izadora, Jaisson, Tayoná, Nathalia, Leila, Marcos, Raquel, Ana Carolina, Thays, Paula, Yuna, Joice, Ana Luísa, Eduardo, Augusto, Daauany, Bruna, Gabriel, Lucas, Lucas T, Janice, Guilherme, Ingo, Bruna, Ketri, Fernanda T, Ana Flávia, Luan, Matheus, Marina, Izadora Consalter, Vitória.

Aos meus amigos de fora da universidade, por me receberem sempre com muita alegria e carinho, nos poucos momentos em que podemos estar reunidos: Regiane, Marciele, Shayane, Luís, Tião, Lucas Jean, Vinicius, Juliano, Ana Paula, Pamela, Maria, Angélica, Alice, Camila H., Gabriele, Guilherme.

Aos meus padrinhos Neri, Maria e Rosa, pelo apoio e incentivo nas horas difíceis.

À empresa Schaff Bier por ter cedido de forma gentil, a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, abrindo as portas de sua empresa para que eu pudesse

coletar as amostras.

Aos técnicos laboratoristas João Paulo, Ronaldo, Camila, Magali e Sinara pela ajuda.

A todas pessoas que de alguma forma me auxiliaram nessa caminhada e que por ventura não tenham sido citadas, família e a todos os meus amigos de verdade, eu quero que saibam que reconheço tudo que fizeram por mim, a força que inculiram no meu pensamento para não desistir e o conforto de saber que nunca estarei só e serei sempre capaz de tudo por maiores que sejam as dificuldades.

“Você nunca alcança o sucesso verdadeiro a menos que você goste do que está fazendo”. (Dale Carnegie)

RESUMO

ABILHÔA, Hélen. C. Z. **Produção de óleos microbianos por leveduras do gênero *Saccharomyces spp.*** 2018. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2018.

A busca por combustíveis alternativos vem ganhando destaque nas últimas décadas, desta forma, o uso de combustíveis derivados da biomassa microbiana tem sido apontado como uma alternativa técnica capaz de minimizar problemas ambientais. As leveduras destacam-se entre os micro-organismos pelo potencial biotecnológico em acumular lipídeos. Os lipídeos microbianos possuem semelhança aos óleos de origem vegetal (tradicionais) servindo como alternativa à produção de biocombustíveis como fonte de energia renovável. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a produção de lipídeos, determinar seu percentual e a composição em termos de ácidos graxos presentes na biomassa das espécies de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* residual de indústria cervejeira e *Saccharomyces boulardii* (Repoflor®, Legrand). Para otimização na produção de biomassa de *S. boulardii* utilizou-se um planejamento experimental fatorial $2^{(4-0)}$ e aplicou-se um delineamento central composto rotacional 2^2 . O rendimento da produção de biomassa de *S. boulardii* foi determinada por gravimetria e os lipídeos extraídos para posterior determinação do perfil de ácidos graxos. De acordo com o planejamento experimental proposto e com base nos resultados experimentais, o ensaio experimental 06 de delineamento central composto rotacional 2^2 apresentou a melhor condição para a produção de biomassa de *S. boulardii* sendo o meio utilizado para seu crescimento constituído por 34,14% de glicose e 0,20% de sulfato de amônio. O potencial de acúmulo e perfil dos lipídeos das leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* foi diferente, sendo que, *S. cerevisiae* apresentou acúmulo de 0,11% de lipídeos e no perfil de ácidos graxos foram identificados 11 ácidos graxos e *S. boulardii* apresentou acúmulo de 0,55% de lipídeos e no perfil de ácidos graxos foram identificados 18 ácidos graxos. Ambas as leveduras estudadas são potenciais produtoras de lipídeos com perfil de ácidos graxos adequados para fins alimentícios e produção de biocombustíveis, já que possuem ácidos graxos insaturados e de cadeias longas.

Palavras-chave: Biocombustíveis, leveduras, ácidos graxos.

ABSTRACT

ABILHÔA, Hélien. C. Z. **Production of microbial oils by gender yeast *Saccharomyces spp.*** 2018. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Curso de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2018.

The search for alternative fuels has been gaining prominence in recent decades, this way the use of fuels derived from microbial biomass, has been pointed out as a technical alternative capable of minimizing environmental problems. The yeasts stand out among the microorganisms for the biotechnological potential in accumulating lipids. Microbial lipids are similar to (traditional) vegetable oils serving as an alternative to the production of biofuels as a source of renewable energy. Thus, the objective of this work was to verify the lipid production and determine your composition in terms of fatty acids present in the biomass of *Saccharomyces cerevisiae* yeast species from the brewing industry and *Saccharomyces boulardii* (Repoflor®, Legrand). To optimize biomass production of *S. boulardii*, a factorial experimental design $2^{(4-0)}$ was used and a rotational composite central design 2^2 was applied. The biomass yield of *S. boulardii*, was determined by gravimetry and your lipids extracted for determination of the fatty acid profile. According to the experimental design proposed and based on the experimental results, the experimental test 06 of the rotational composite central design 2^2 presented the best condition for the production of biomass of *S. boulardii* being the medium used for its growth consisting of 34.14% of glucose and 0.20% of ammonium sulfate. The potential of accumulation and lipid profile of yeasts *S. cerevisiae* and *S. boulardii* was different, and *S. cerevisiae* presented accumulation of 0,11% of lipids and 11 fatty acids were identified in the fatty acid profile and *S. boulardii* presented accumulation of 0,55% of lipids and in the profile of fatty acids 18 fatty acids were identified. Both yeasts studied are potential producers of lipids with a fatty acid profile suitable for food and biofuel production.

Keywords: Biofuels, yeasts, fatty acids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Separação das duas fases pós filtragem (solvente+ lipídeos e água+ metanol + substâncias não lipídicas).....	29
Figura 2 - Balão de fundo chato contendo lipídeos após rota-evaporação dos solventes.....	29
Figura 3 - Mistura reacional de duas fases (clarificada e turva).	31
Figura 4 - Gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na produção de biomassa por <i>S. boulardii</i>	38
Figura 5 - Gráfico curvas de nível efeitos das variáveis independentes na produção de biomassa por <i>S. boulardii</i>	39
Figura 6 - Cromatograma da levedura <i>S. cerevisiae</i>	41
Figura 7 - Cromatograma da levedura <i>S. boulardii</i>	42
Figura 8 - Cromatograma do Padrão Sigma Aldrich para ácidos graxos	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela 1. Matriz do delineamento experimental $2^{(4-0)}$ e os níveis das variáveis estudadas.....	26
Tabela 2 - Matriz do delineamento central composto rotacional 2^2 e os níveis das variáveis estudadas.....	27
Tabela 3 - Resultados da produção de biomassa de <i>S. boulardii</i>	34
Tabela 4 - Estimativas dos efeitos de cada variável, suas interações e significância ($p \leq 0,05$).....	35
Tabela 5 -Produção de biomassa de <i>S. boulardii</i>	36
Tabela 6 -Estimativa dos efeitos de cada variável, suas interações e significância com $p \leq 0,05$ na produção de biomassa de <i>S. boulardii em DCCR 2^2</i>	37
Tabela 7- Quantificação lipídica e composição de ácidos graxos presente nas leveduras <i>Saccharomyces ssp.</i>	40
Tabela 8 -Resultados de produção de lipídeos por leveduras oleaginosas e composição dos ácidos graxos de algumas origens vegetais	44
Tabela 9 - Índices de qualidade nutricional da fração lipídica das leveduras <i>Saccharomyces boulardii</i> e <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos graxos
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO	Demanda Biológica de Oxigênio
DCCR	Delineamento central composto rotacional
DOE	Delineamento de experimentos
GEE	Gases do Efeito Estufa
IA	Índice de Aterogenicidade
IT	Índice de Trombogenicidade
LP	Partículas lipídicas
LT	Lípídeos totais
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MME	Ministério de Minas e Energia
OY	<i>Oil Yeasts</i> (óleo de levedura)
SCO	<i>Single Cell Oil</i> (óleo de célula única)
STE	<i>Ésteres de esterilo</i>
TAG	Triacilgliceróis
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
YEPG	<i>Yeast Extract-Peptone-dextrose</i>
IQN	Índice de Qualidade Nutricional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 BIOCUMBUSTÍVEIS	17
3.2 LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO	18
3.3 PRODUÇÃO DE ÓLEOS MICROBIANOS POR LEVEDURAS	20
3.4 TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DE CONTEÚDO LIPÍDICO	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS	25
4.2 BIOENSAIOS	25
4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	26
4.4 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E <i>Saccharomyces boulardii</i>	27
4.4.1 Extração dos lipídeos	27
4.4.2 Transesterificação dos lipídeos extraídos	30
4.4.3 Caracterização dos lipídeos	32
4.4.4 Índices da qualidade nutricional dos lipídeos (IQN)	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 EFEITO E INTERAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE DIFERENTES NUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Saccharomyces boulardii</i>	34
5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>Saccharomyces boulardii</i>	36
5.3 PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> E <i>Saccharomyces boulardii</i>	39
5.4 AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DA QUALIDADE NUTRICIONAL DOS LIPÍDEOS (IQN).....	45
6 CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

As necessidades energéticas do homem estão em constante evolução e fatores como a disponibilidade de recursos, interesses comerciais, domínio de tecnologias e a preservação do meio ambiente levaram os países a diferentes escolhas para a composição de sua matriz energética (FARIAS e SELLITTO, 2011).

A busca por combustíveis alternativos vem ganhando destaque nas últimas décadas. A substituição dos combustíveis fósseis tem sido motivada por fatores ambientais, econômicos e sociais, uma vez que toda a sociedade depende de seu uso. Nesse contexto, uma alternativa que se tem destacado é o uso de biocombustíveis. O uso de combustíveis derivados da biomassa tem sido apontado como uma alternativa técnica capaz de minimizar problemas ambientais tais como hidrocarbonetos, monóxido e dióxido de carbono, além de materiais particulados e óxidos de enxofre, esses últimos responsáveis pela chuva ácida, causados pela queima de combustíveis fósseis (SILVA, MANGRICH e CORDEIRO, 2011).

A produção de biocombustíveis representa uma alternativa de energia limpa e ambientalmente segura, pois são combustíveis produzidos a partir da biomassa (matéria orgânica) de fontes renováveis – produtos vegetais ou compostos de origem animal. As fontes mais conhecidas no mundo são cana-de-açúcar, milho, soja, semente de girassol, madeira e celulose (MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIAS e PETROBRÁS, 2007).

O biodiesel, substituto natural do diesel de petróleo, que pode ser produzido a partir de fontes renováveis como óleos vegetais, gorduras animais e óleos utilizados para cocção dos alimentos, é uma mistura de ésteres de ácidos graxos com monoálcoois de cadeia curta, como o metanol ou o etanol (SUAREZ et al., 2007).

No entanto, o biodiesel oriundo de oleaginosas, bem como de óleos de fritura e de gordura animal, não pode atender sequer uma pequena parte da demanda global de biocombustíveis, uma vez que exigiria uma extensão proibitiva de áreas cultiváveis, mesmo para um país com dimensões continentais como o Brasil (SILVA, MANGRICH e CORDEIRO, 2011).

Desta forma, micro-organismos, tais como bactérias, bolores, leveduras e algas, são candidatos promissores como matéria-prima em potencial para atender à crescente demanda mundial de biocombustíveis (FAKAS et al, 2009; ANDRÉ et al, 2010; AGEITOS et al., 2011; PAPANIKOLAOU et al., 2011; AMARETTI et al., 2010;

KATRE et al., 2012; HUANG et al., 2013; ANSCHAU et al., 2014; YANG et al., 2015; AKPINAR-BAYIZIT et al., 2016; YALLEPU et al., 2016; TASKIN et al., 2016; SHEN et al., 2016; SELVAKUMAR et al., 2017; PROBST E VADLANI, 2017; PAPANIKOLAOU et al., 2016).

A capacidade de alguns microrganismos em produzir quantidades significativas de lipídeos, chamados de “*Single Cell Oil*” (SCO) vem recebendo grande atenção da comunidade científica. Os lipídeos microbianos, cujas composições são semelhantes aos óleos tradicionalmente utilizados na produção do biodiesel são alternativas à produção deste combustível reduzindo seu custo de produção e tornando o processo sustentável.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar o percentual de lipídeos e a composição de ácidos graxos presente na biomassa de leveduras do gênero *Saccharomyces spp.*

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar o potencial de *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae* em produzir óleos microbianos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar bioensaios para determinar a influência no efeito e interações das concentrações de diferentes nutrientes na produção de biomassa de *Saccharomyces boulardii*;
- ✓ Otimizar a produção de biomassa de *Saccharomyces boulardii*;
- ✓ Determinar a porcentagem de lipídeos totais e analisar a composição em termos de ácidos graxos da biomassa produzida pelas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*;
- ✓ Comparar a composição de ácidos graxos das leveduras estudadas.
- ✓ Determinar os índices da qualidade nutricional dos lipídeos das leveduras estudadas.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A pesquisa bibliográfica é o primeiro passo de um trabalho científico. Por meio dela é possível coletar e verificar a parte teórica sobre os temas e assuntos que serão de interesse no andamento do trabalho científico (DMITRUK, 2001).

3.1 BIOCOMBUSTÍVEIS

Atualmente há um grande crescimento no que tange a respeito do interesse por fontes alternativas de energia, principalmente por aquelas que contribuem para mitigar as grandes emissões de CO₂, característica das fontes tradicionais de energia fóssil. A utilização de biocombustíveis, como bio-etanol, óleo de dendê e biodiesel produzido pela esterificação de óleos vegetais com metanol e etanol, são vistos como alternativas viáveis (URQUIAGA, 2005).

De acordo com Urquiaga (2005) o balanço energético do combustível se dá a partir da relação entre o total de energia contida no biocombustível e o total de energia fóssil investida em todo o seu processo de produção, incluindo-se o processo agrícola e industrial.

A crise do petróleo que vem se instaurando nas últimas décadas, juntamente com o aumento da demanda por combustíveis e à crescente preocupação com o meio ambiente, preconizou a busca por fontes alternativas de energia no Brasil e no mundo. Atualmente toda a produção mundial de biocombustíveis baseia-se nas chamadas tecnologias de primeira geração, ou seja, produção de etanol a partir de açúcares ou amidos (cana, beterraba, milho, trigo, mandioca) e biodiesel de óleos vegetais ou gordura animal (soja, mamona, dendê, sebo, óleo de fritura) (LEITE, 2007).

Diversas tecnologias que utilizam os materiais lignocelulósicos como matérias-primas (resíduos agroflorestais, madeira de florestas plantadas, culturas energéticas de curto ciclo, lixo urbano), que são mais baratos, mais abundantes e podem ser produzidos nas mais variadas condições de solo e clima estão sendo estudadas e estão em desenvolvimento (LEITE, 2007).

Segundo o Ministério do Meio Ambiente – MMA (2014) podem ser considerados como biocombustíveis: o bioetanol, biodiesel, biogás, biomassa, biometanol – que são os mais utilizados, além do bioéter dimetílico, bio-ETBE, bio-MTBE, biocombustíveis sintéticos e biohidrogênio (CARVALHO e FERREIRA, 2014).

Os biocombustíveis, derivados da matéria orgânica denominada de biomassa, apresentam-se em relação à diminuição da emissão de poluentes na atmosfera, como excelente alternativa (ULHOA, 2013).

As pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de novos insumos básicos, de caráter renovável, para a produção de combustíveis que possam substituir os derivados de petróleo, o que coloca a biomassa em um papel de destaque, em razão da sua natureza renovável, ampla disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo.

Desta forma, a biomassa apresenta-se com um potencial considerável no que diz respeito a geração de energia e produção de combustíveis renováveis, como por exemplo o bioetanol, biodiesel e o biogás (CINELLI, 2012).

A utilização dos biocombustíveis segundo especialistas oferece diversas vantagens, bem como algumas desvantagens. Algumas das principais vantagens são a menor emissão de gases poluentes durante a combustão, a contribuição para o aumento de emprego na zona rural, a redução da dependência de fontes combustíveis de origem fóssil, ser uma fonte renovável, as grandes áreas para cultivo disponíveis no Brasil, o menor investimento financeiro em pesquisas, pois as pesquisas de prospecção de petróleo são muito dispendiosas, e a redução de alguns tipos de resíduos, que podem ser utilizados para a produção de alguns tipos de biocombustíveis (FALSETTI, 2010).

Os lipídeos, incluindo óleos vegetais e gorduras animais, servem como alternativas para reduzir a dependência de matéria-prima de petróleo para uma produção sustentável de biodiesel e outros oleoquímicos, incluindo surfactantes, lubrificantes e até mesmo produtos farmacêuticos (YANG et al., 2015).

3.2 LEVEDURAS COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

As leveduras podem ser classificadas como fungos unicelulares, os quais possuem a capacidade de crescer em diversas fontes de carbono, geram grande volume de biomassa e ampla aplicabilidade industrial e comercial (SCENI et al., 2009). As leveduras são usualmente aplicadas na indústria de panificação, produção de bebidas alcoólicas e etanol. Em nível mundial, calcula-se que seja produzido em torno de 2 milhões de toneladas de leveduras anualmente, as quais tem destinação exclusiva para as indústrias de panificação, fazendo dessa forma com que esses

microrganismos sejam vistos como importantes produtos da biotecnologia (BAPTISTA, 2001).

Sabe-se que as leveduras são exploradas há milhares de anos pelo homem na produção de vinho e cerveja e na fermentação do pão, porém somente há aproximadamente dois séculos se teve a devida comprovação de sua ação.

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são utilizadas nas indústrias cervejeiras conforme o tipo de fermentação que se deseja (baixa ou “lager”; alta ou “ale”). As leveduras empregadas nas fermentações do tipo “lager” (*S. uvarum*) tendem a formar uma massa no fundo dos tanques, enquanto que as utilizadas na fermentação do tipo “ale” (*S. cerevisiae*) tendem a fermentar na superfície dos tanques fermentadores. No entanto, após o término do processo fermentativo as leveduras são descartadas, gerando desta forma grandes volumes de células excedentes (ZECHNER-KRPAN, 2010; COSTA, et al., 2012). Este fato sentencia, portanto, a busca de utilizações alternativas para este subproduto, buscando atenuar os impactos ambientais.

As células excedentes de leveduras descartadas pela indústria cervejeira possuem potencial biotecnológico, fazendo com que essas possam ser utilizadas diretamente ou ainda possam ser processadas para que haja a obtenção de derivados das mesmas, como por exemplo extratos proteicos. Na composição das leveduras, destacam-se os aminoácidos, pois estes devem ser estritamente balanceados, principalmente no que tange a respeito dos ácidos glutâmico, aspártico, a leucina e a alanina (SGARBIERI et al., 1999).

Muitos estudos vêm explorando componentes isolados de leveduras como enzimas, nucleotídeos, proteínas, polissacarídeos e lipídeos, pois, estas substâncias apresentam propriedades específicas de interesse biotecnológico e conseqüentemente de grande valor agregado (ADAMS, 2004; PAVLOVA et al., 2005).

A levedura *Saccharomyces boulardii* foi descoberta e isolada primeiramente na Indochina por volta dos anos 50, esta foi isolada de uma fruta silvestre conhecida como Lichia (MULLER et al., 2007). Desde a sua descoberta até a atualidade, esta vem sendo utilizada como probiótico e adicionada a dieta alimentar. Serve de suplemento alimentar, rico em micro-organismos vivos, que afetam benéficamente quem as consome, através da melhoria do balanço da microbiota intestinal, tratando diarreias. Os probióticos são substâncias ativas que são consideradas medicamentos e possuem regulação oficial em quase 100 países (MULLER et al., 2007).

A levedura *Saccharomyces boulardii* é uma espécie não patogênica, termotolerante (cresce na temperatura de 37°C) e de uso muito difundido na medicina (MARTINS, BARBOZA e NICOLI, 2009) pelo seu potencial probiótico (MULLER, 2006). Ainda conforme a grande capacidade terapêutica da levedura *S. boulardii*, estas cepas têm sido utilizadas na agregação de valor de resíduos agroindustriais destinados alimentação animal com a finalidade da regulação intestinal dos mesmos (LAMSAL, PATHIRAPONG e RAKSHIT, 2012). Na produção de alimentos baseados na fermentação de vegetais para agregar valor e qualidade probiótica a esses alimentos (HUNG e HERVE, 1995), aplicada na alimentação de prematuros com problemas intestinais visando a maturação do intestino (COSTALOS et al., 2003), utilização em produtos lácteos na substituição de *Saccharomyces cerevisiae* para aumento da capacidade probiótica dos mesmos (PINOS-RODRÍGUEZ et al., 2008) entre outras diversas aplicações industriais.

Os produtos de levedura são ricos em vitaminas do complexo B, minerais, macro e micronutrientes, particularmente o selênio e fibra dietética, que é apresentada por carboidratos da parede celular, principalmente mananas e glucanas, além de apresentar elevado teor em proteína (30% a 70%) (YAMADA et al., 2003). Todavia, a utilização dos mesmos vem sendo limitada pela baixa digestibilidade da parede celular, rígida e muito resistente à ação de enzimas digestivas (GALVEZ et al., 1990).

3.3 PRODUÇÃO DE ÓLEOS MICROBIANOS POR LEVEDURAS

Os óleos microbianos, chamados de “*Single cell oils*”, são de potencial interesse industrial devido às suas características bioquímicas e físico-químicas específicas (AGEITOS et al., 2011). Bactérias oleaginosas acumulam lipídeos tais como os polihidroxicanoatos. Em contraste, leveduras e bolores oleaginosos acumulam triacilglicerol ou triglicerídeos ricos em ácidos graxos polinsaturados ou com estrutura específica, que são os principais componentes do óleo vegetal (PAPANIKOLAOU et al., 2011).

Leveduras oleaginosas (*Oil Yeasts* – OY) possuem o poder de acumular mais de 20% de lipídeos (MENG et al., 2009; AGEITOS et al., 2011). Tais leveduras são capazes de produzir ácidos graxos similares aos dos óleos vegetais, com potencial aplicação para a produção de biodiesel (ZHAO et al., 2008) utilizando a reação de

transesterificação em que o triglicerídeo reage com metanol na presença de um catalisador ácido (HCl ou H₂SO₄) ou básico (NaOH ou KOH), para a produção de ésteres metílicos de ácidos graxos e glicerol (THLIVEROS et al., 2014) tal fato deve-se ao estado metabólico induzível por elevada razão carbono/nitrogênio.

O principal fator que determina o acúmulo de lipídeos em microrganismos é a razão Carbono/Nitrogênio, sendo que excesso de carbono e limitação de nitrogênio favorecem o processo (AGEITOS et al., 2011).

Em todos os tipos de células, lipídeos neutros são armazenados como reserva de energia e uma fonte de blocos de construção necessários para a formação da membrana. Isto também é verdadeiro para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que sintetiza triacilgliceróis (TAG) e ésteres de esterilo (STE) como os lipídeos de armazenamento mais proeminentes (DAUM et al., 2007). Tal como em outros eucariotos, as leveduras TAG e STE formam o núcleo das chamadas partículas lipídicas (LP), uma estrutura intracelular globular que é sequestrada do ambiente citosólico por uma monocamada de fosfolipídeos contendo um pequeno conjunto de proteínas. As vias metabólicas que conduzem à formação de lipídeos neutros e reações hidrolíticas catalisando sua mobilização são semelhantes nos diferentes reinos da vida (DAUM et al., 2007).

As leveduras são microrganismos tradicionalmente utilizados em processos fermentativos. Segundo Ageitos et al. (2011) os gêneros de leveduras oleaginosas incluem: *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Lipomyces* e mais especificamente espécies como: *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis* e *Yarrowia lipolytica*. Espécies como *Lipomyces starkeyi*, acumulam até aproximadamente 70% do peso seco em lipídeos (ANGERBAUER et al., 2008).

O alto teor de lipídeos produzidos, aliado à grande produtividade em biomassa, torna as leveduras excelentes meios para a produção de óleo microbiano, o qual pode ser utilizado em diferentes finalidades (POLI et al., 2013, 2014, MATTANA et al., 2014), como por exemplo: surfactantes naturais, biocombustíveis, insumos na indústria de alimentos e de cosméticos (VASUDEVAN e BRIGGS, 2008).

Os óleos de célula única (SCO) produzidos por microrganismos oleaginosos vêm sendo amplamente estudados como alternativa aos óleos baseados em plantas para síntese de biodiesel. Os microrganismos oleaginosos são considerados hoje em dia candidatos promissores por apresentarem características particulares, como por

exemplo não serem afetados pelas estações, possuírem altos teores de lipídeos, capacidade de produção a partir de uma diversidade de fontes de carbono e paridade na composição de ácidos graxos com a dos óleos vegetais.

Tendo em vista sua capacidade de atingir densidades celulares elevadas numa variedade de matérias primas de baixo custo tais como açúcares industriais, resíduos agrícolas entre outros, as leveduras oleaginosas têm atraído um interesse significativo (BRAR et al., 2017).

As técnicas de fermentação utilizadas durante a produção de SCO de levedura diversas vezes acabam por controlar a relação C/N, limitando a quantidade de nitrogênio, ou seja, fornecendo carbono em excesso (vezes na forma de glicose, vezes na forma de algum outro substrato de açúcar). Sem o nitrogênio disponível, o metabolismo muda para síntese de triacilglicerol (TAG) para armazenamento de energia até que as condições de crescimento favoráveis retornem (RATLEDGE, 2004). Leveduras podem gerar lipídeos a partir de diferentes fontes de carbono e mesmo a partir de lipídeos presentes nos meios de cultura (AGEITOS et al., 2011).

A limitação de nitrogênio vem sendo utilizada a fim de se criar um ambiente favorável à acumulação de lipídeos. Com uma relação C/N maior que 1 garante-se que o nitrogênio seja totalmente consumido, enquanto que os outros nutrientes, incluindo o carbono, permaneçam em excesso no meio de cultivo (MEESTERS et al., 1996).

O óleo extraído das leveduras, como dito anteriormente pode ser utilizado como matéria-prima para muitos bio-produtos, porém a falta de técnicas eficientes para a extração e separação do óleo tem limitado a utilização industrial dos processos de fermentação de SCO (WILLIS, 2014).

3.4 TÉCNICAS PARA DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO LIPÍDICO

Diversos fungos filamentosos, leveduras e algas exibem uma capacidade de acumular lipídeos intracelulares de até 60-70% da sua biomassa quando cultivados em matérias-primas variadas sob condições submersas.

A estimativa do conteúdo lipídico é realizada normalmente por extração com a utilização de solvente e posteriormente por pesagem. No entanto, o método convencional é lento, tornando por sua vez o controle rápido e eficiente do processo de fermentação difícil. Diante disso, algumas tentativas foram realizadas a fim de

desenvolver novos métodos que facilitem tal controle e eficiência. Métodos baseados na capacidade que alguns compostos possuem para formar produtos fluorescentes solúveis em lipídeos ou ligar-se a grupos específicos da molécula lipídica foram relatados (THAKUR, 1988).

As mais relevantes desvantagens das técnicas baseadas na formação de compostos fluorescentes e reações enzimáticas são que tais técnicas geralmente requerem acumulação preliminar de uma grande biomassa, liofilização e o tratamento do material é bem demorado. Além de que, nos métodos fluorimétricos, a coloração não específica, brilho insuficiente, ou a presença de substâncias fluorescentes estrangeiras podem impor limitações extras. O *Sudan Black B* foi relatado por Burdon (1946) e Evans et al. (1985) como sendo um método eficaz para a detecção de gorduras microbianas (THAKUR, 1988).

Os métodos utilizados para extração de lipídeos devem ser rápidos, eficientes e delicados, visando dessa forma diminuir o processo de degradação dos lipídeos e triacilgliceróis. Os solventes utilizados na extração lipídica devem ser baratos, voláteis (para uma remoção mais rápida), de baixa toxicidade, puros, imiscível em água e seletivos, ou seja, que não sejam extratores para compostos indesejáveis (VIEGAS, 2010).

Bligh e Dyer (1959) modificaram e propuseram um método rápido para extração e purificação de lipídeos totais utilizando técnica de extração a frio clorofórmio: metanol: água (2:1:0,8 v/v), tal técnica permite que a qualidade da fração lipídica não seja afetada. Tal método é bastante estudado e conhecido pelos pesquisadores da área para determinação de lipídeos totais (VIEGAS, 2010).

A cromatografia gasosa, utilizada para avaliar a composição de ácidos graxos, é uma técnica empregada na separação de gases ou substâncias voláteis. A separação baseia-se na diferente distribuição das substâncias de uma amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) em uma fase móvel (gasosa). A amostra é introduzida na coluna, que contém o líquido volátil ou sólido (FE), por meio de um sistema de injeção. Os componentes da amostra são vaporizados e, de acordo com suas características são retidos e eluídos através da coluna em tempos diferentes.

A amostra gasosa ou líquida volatilizada é introduzida na corrente do gás de arraste que a leva sobre a FE numa coluna. Os constituintes se distribuem entre FE e FM (gás), movendo-se a porção que está na fase vapor com o gás de arraste. Podem ser separados e saem da coluna em tempos diferentes característicos da coluna e

das condições experimentais (vazão da FM, T (tempo). Ao sair da coluna, os constituintes, separados, passam por um dispositivo onde são detectados, emitindo um sinal elétrico que é registrado, constituindo o que se denomina cromatograma. (HARRIS, 2008; ENGEL et al., 2013).

A partir do perfil de ácidos graxos extraídos pelo método Bligh e Dyer, pode-se obter alguns índices que caracterizam tais lipídeos, chamados de índices de qualidade lipídica. Para avaliação da qualidade da gordura em alimentos, Ulbricht e Southgate propuseram em 1991 cálculos matemáticos que determinam o potencial aterogênico e trombogênico dos alimentos. Estes cálculos são conhecidos como índice aterogênico (IA) e o índice trombogênico (IT) cuja finalidade é identificar o potencial de um alimento ou de um lipídeo em contribuir para o surgimento de doenças cardiovasculares (ULBRICHT; SOUTHGATE, 1991).

Os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade IT) são utilizados para quantificar o potencial de estímulo à agregação plaquetária, pois desordens na agregação de plaquetas podem vir a ocasionar trombooses. Dessa forma, quanto menores forem os valores de IA e IT maior será a quantidade de ácidos graxos anti-aterogênicos e antitrombogênicos presentes em determinado óleo e, portanto, maior será o potencial de prevenção ao aparecimento de doenças coronarianas (TURAN et al., 2007). Esses índices fazem parte de uma ferramenta matemática importante para compreender o valor nutricional das gorduras.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DAS AMOSTRAS

A levedura residual da indústria cervejeira, da espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi gentilmente cedidas pela cervejaria Schaf Bier, localizada no município de Francisco Beltrão - PR. O creme de leveduras ou leveduras residuais foi coletado diretamente nos reatores de fermentação, acondicionadas em garrafas PET devidamente limpas e higienizadas e mantidas em geladeira até a realização das análises.

A levedura *Saccharomyces boulardii* foi obtida a partir do produto comercial (Repoflor®, Legrand) contendo 4×10^9 células liofilizadas em cada cápsula (200 mg) e reativadas como descrito no item 4.2.

4.2 BIOENSAIOS

O pré-inóculo da levedura *Saccharomyces boulardii* foi preparado em condições assépticas, sendo as cápsulas previamente desinfetadas externamente com álcool 70%.

Em 100 mL de meio de cultura para levedura esterilizada (YEPG: Glicose – 1g%, Ext. levedura – 0,3g% e Peptona bacteriológica – 0,5g%) foi adicionado uma cápsula (200 mg da levedura), seguido de homogeneização e posteriormente de incubação em câmara incubadora com agitação orbital (*shaker*) em temperatura de 30°C sob agitação de 100 rpm, durante 12 horas. Após esse período alíquotas de 1% (v/v) (5 mL) do inóculo foram transferidas de forma asséptica com o auxílio de pipeta automática para os dezesseis frascos Erlenmeyers com capacidade para 250 mL contendo as variáveis independentes diluídas em 100 mL de água destilada. Cada variável independente foi adicionada ao meio de acordo com as concentrações estabelecidas pelo planejamento fatorial $2^{(4-0)}$ obtido pelo programa computacional Statistica 8.0. Após esse procedimento os frascos Erlenmeyers foram incubados em câmara incubadora com agitação orbital (*shaker*) em temperatura de 30°C sob agitação de 100 rpm durante 72 horas, para posterior realização das análises laboratoriais.

4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

O planejamento experimental fatorial $2^{(4-0)}$ foi aplicado para determinar a influência no efeito e interações das concentrações de diferentes nutrientes na produção de biomassa de *Saccharomyces boulardii*. As variáveis foram estabelecidas em dois níveis de variação codificados como -1 (mínimo) e +1 (máximo). A Tabela 1 mostra a matriz do delineamento experimental $2^{(4-0)}$ e os níveis das variáveis estudadas.

As variáveis independentes estudadas no delineamento experimental fatorial $2^{(4-0)}$ foram: glicose (X1), sacarose (X2), extrato de levedura (X3), sulfato de amônio (X4). A variável dependente (resposta) foi a produção de biomassa.

Tabela 1 - Matriz do delineamento experimental $2^{(4-0)}$ e os níveis das variáveis estudadas.

Ensaio	Glicose (X1)	Sacarose (X2)	Ext. de levedura (X3)	Sulfato de Amônio (X4)
1	0,1	0,1	0,05	0,05
2	0,1	0,1	0,05	0,15
3	0,1	0,1	0,15	0,05
4	0,1	0,1	0,15	0,15
5	0,1	0,5	0,05	0,05
6	0,1	0,5	0,05	0,15
7	0,1	0,5	0,15	0,05
8	0,1	0,5	0,15	0,15
9	0,5	0,1	0,05	0,05
10	0,5	0,1	0,05	0,15
11	0,5	0,1	0,15	0,05
12	0,5	0,1	0,15	0,15
13	0,5	0,5	0,05	0,05
14	0,5	0,5	0,05	0,15
15	0,5	0,5	0,15	0,05
16	0,5	0,5	0,15	0,15

Fonte: Autoria própria (2018)

Após verificar a influência no efeito e interações das concentrações de glicose (X1), sacarose (X2), extrato de levedura (X3) e sulfato de amônio (X4) e selecionar as variáveis mais significativas na produção de biomassa de *Saccharomyces boulardii*, aplicou-se um delineamento central composto rotacional 2^2 para a otimização da produção de biomassa de *S. boulardii* (Tabela 2).

Tabela 2 - Matriz do delineamento central composto rotacional 2² e os níveis das variáveis estudadas.

Ensaio	Glicose (g.100 mL)	Sulfato de amônio (g.100 mL)
1	10,00	0,10
2	10,00	0,30
3	30,00	0,10
4	30,00	0,30
5	5,86	0,20
6	34,14	0,20
7	20,00	0,06
8	20,00	0,34
9	20,00	0,20
10	20,00	0,20
11	20,00	0,20

Fonte: Autoria própria (2018)

4.4 DETERMINAÇÃO DA PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS DE *Saccharomyces cerevisiae* E *Saccharomyces boulardii*

4.4.1 Extração dos lipídeos

Os lipídeos produzidos pelas leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* foram extraídos de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959).

As leveduras residuais de cervejaria, *S. cerevisiae*, foram utilizadas na forma *in natura* e lavadas. Foram centrifugadas (3000 rpm por 10 minutos). Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se água destilada às leveduras residuais e procedeu-se a homogeneização. Após formar uma solução, as leveduras residuais foram novamente centrifugadas. Esse processo de lavagem das leveduras residuais foi realizado três vezes, obtendo-se a biomassa para realizar a extração de lipídeos. Para obtenção da biomassa de *S. boulardii* não foi necessário o processo de lavagem da biomassa, realizou-se apenas a centrifugação (3000 rpm por 10 minutos).

Para obtenção da porcentagem de lipídeos procedeu-se da seguinte forma: as amostras das leveduras foram submetidas em triplicata a extração com mistura de solventes Clorofórmio:Metanol:água a frio (Bligh e Dyer – 1959), cada amostra continha 15 g de biomassa (80% de umidade).

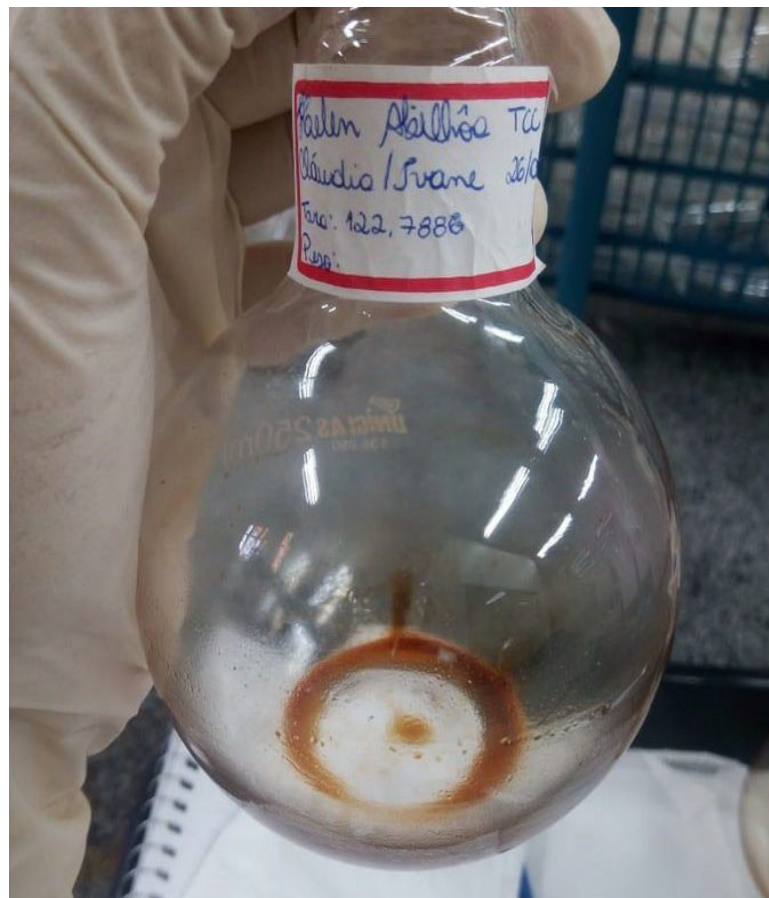
Foram pesados 15 gramas da biomassa das leveduras *S. boulardii* e *S. cerevisiae* (contendo aproximadamente 80% de umidade) em Becker com capacidade para 250 mL e adicionou-se uma solução de metanol:clorofórmio (2:1) (30mL de metanol:15 mL de clorofórmio) e agitou-se por 5 minutos com agitador magnético. Após 5 minutos de agitação, adicionou-se mais 15 mL de clorofórmio e agitou-se novamente com agitador magnético por 2 minutos. Adicionou-se 15 mL de água e agitou-se novamente por 5 minutos. Posteriormente, as soluções obtidas de *S. boulardii* e *S. cerevisiae* foram filtradas em Buchner (à vácuo) em membranas Millex® 0,22 µm. Após a filtração, lavou-se cada Becker com 10 mL de clorofórmio e agitou-se por 5 minutos e novamente foi feita a filtração em Buchner utilizando o mesmo papel filtro da primeira filtragem. Lavou-se o Becker novamente com 10 mL de clorofórmio finalizando o processo de filtragem, obtendo-se o filtrado completo. Transferiu-se cada filtrado obtido para funil de separação com capacidade para 250 mL (Figura 1). Após 24 horas em repouso em temperatura ambiente, observou-se a formação de duas fases distintas: uma fase inferior contendo clorofórmio e lipídeos e uma fase superior contendo metanol, água e substâncias não lipídicas (formando emulsão entre as duas fases). Assim, a fase de clorofórmio com lipídeos (fase inferior) foi coletada e transferida para balões de fundo chato previamente pesados com capacidade para 250 mL e assim levados para rota-evaporador (33-34°C) por aproximadamente 10 minutos. Posteriormente, os balões de fundo chato foram levados para estufa a 50°C por 1 hora. Após a evaporação completa do clorofórmio, os balões de fundo chato foram levados para o dessecador para resfriamento e em seguida pesados para obter a quantidade de lipídeos presente nas amostras (Figura 2).

Figura 1 - Separação das duas fases pós filtragem (solvente+ lipídeos e água+ metanol + substâncias não lipídicas).



Fonte: A autora (2018).

Figura 2 - Balão de fundo chato contendo lipídeos após rota- evaporação dos solventes.



Fonte: Autoria própria (2018)

Após a extração, as amostras foram transferidas para funil de separação, e coletou-se em balão de fundo chato (previamente pesado) a fase inferior contida no funil de separação após cerca de 12 horas. Tal fase continha solvente e lipídeos. Após a evaporação do solvente em rota-evaporador, pesou-se o balão de fundo chato e dessa forma obteve-se o peso do balão + lipídeos.

Para que se pudesse realizar o cálculo da porcentagem de lipídeos, utilizou-se a seguinte equação:

$$x1 = \text{peso balão} + \text{peso (lipídeos)} - \text{peso balão}$$

$$x = \frac{X1 \times 100\%}{\text{biomassa amostra}}$$

Onde:

X1 = massa de lipídeos pesada após evaporação total do solvente

X = porcentagem de lipídeos presente na amostra de levedura

Biomassa amostra = peso em gramas da biomassa da amostra

4.4.2 Transesterificação dos lipídeos extraídos

Os lipídeos totais (LT) extraídos (item 5.3.1) foram transesterificados em ácidos graxos metilados conforme método 5509 da ISO (1978). Para isso, foi adicionado 4 mL de n-heptano em uma das triplicatas de balão de fundo chato contendo os lipídeos extraídos e foi homogeneizado. Desse balão de fundo chato formou-se uma mistura reacional que foi transferida para o segundo balão de fundo chato e depois para o terceiro balão de fundo chato. Reservou-se. Em seguida, preparou-se uma solução de KOH com metanol (2 Mol por litro) (Equação 1). Foram pesados em copo béquer previamente tarado, cerca de 2,8571 g de KOH (equivalentes a 2 mL para KOH com pureza de 98%) (Equação 2) e após transferido para balão volumétrico com capacidade para 25 mL e completou-se o volume restante do balão com metanol. A solução de KOH + metanol foi homogeneizada, e após transferiu-se 2 mL desta para um tubo de ensaio com tampa de rosca, no qual também adicionou-se 2 mL da mistura reacional (lipídeos extraídos + n-heptano) agitou-se em vórtex por 2 minutos. A mistura reacional permaneceu em repouso durante 4 horas para separação de fases (Figura 3). A fase superior (fase clara) foi coletada com auxílio de pipeta de pasteur e transferida para tubos *ependorff*, que foram congelados até o momento da análise (ISO 5509, 1978).

$$m = \frac{m_i}{MM1 \times U} \rightarrow 2,0 = \frac{m_i}{56 \times 0,025} \quad m1 = 2,8 \text{ g} \quad (1)$$

Onde:

m= volume equivalente de KOH

U = volume do balão (25 mL)

MM1 = massa molar do KOH (56g/mol)

m1= massa pesada de KOH considerando 100% de pureza

$$m2 = \frac{m1 \times p1}{p2} \rightarrow m2 = \frac{2,8 \times 100\%}{98\%} \quad m2 = 2,8571 \text{ g} \quad (2)$$

Onde:

m2= massa pesada de KOH considerando a pureza real do reagente

m1 = massa pesada de KOH considerando 100% de pureza

p1 = pureza ideal

p2 = pureza real do reagente

Figura 3 - Mistura reacional de duas fases (clarificada e turva).



Fonte: Autoria própria (2018)

4.4.3 Caracterização dos lipídeos

Os ácidos graxos metilados foram separados por Cromatografia Gasosa equipado com Flame Ionization Detector (FID) e uma coluna de capilar de sílica fundida SPTM- 2560 (100m x 0,25 mm xl.D., 0,20µm film, 24056). O hélio foi utilizado como gás de arraste, à vazão de 20 cm/seg. O volume de injeção foi de 1,0 µL e o “split” à razão de 100:1. Foi utilizado como padrão para as análises o FAME Mix (C4-C28) Sigma. As injeções foram realizadas em duplicata afim de que pudesse obter uma média e desvio padrão das amostras.

A identificação dos ésteres metilados de ácidos graxos (FAME) foi realizada pela comparação entre o tempo de retenção e a concentração dos constituintes da amostra com uma mistura de 37 padrões de éster metílico de ácidos graxos da Sigma-Aldrich.

Os dados foram calculados como percentual de área normalizada dos ácidos graxos totais.

4.4.4 Índices da qualidade nutricional dos lipídeos (IQN)

Utilizando-se o perfil lipídico, determinou-se a qualidade nutricional da fração lipídica das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii* através de dois índices: aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT).

O índice de aterogenicidade (IA) foi calculado através da equação de Ulbricht e Southgate (1991): $IA = [(C12:0) + (4 \times C14:0) + (C16:0)] / [(AGPI\ n-6 + AGPI\ n-3) + AGMI]$. O índice de trombogenicidade (IT) foi calculado utilizando a equação de Ulbricht e Southgate (1991):

a) Índice de Aterogenicidade

$$IA = \frac{[(C12:0) + (4 \times C14:0) + (C16:0)]}{(\Sigma AGMI + \Sigma n - 6 + \Sigma n - 3)}$$

Onde:

C12:0 : ácido láurico;

C14:0 : ácido mirístico;

C16:0 : ácido palmítico;

ΣAGMI: soma das concentrações de todos os AG monoinsaturados;

Σn-6: a soma das concentrações dos AG poli-insaturados ômega 6 e;

Σn-3: soma das concentrações de poliinsaturados ômega 3.

b) Índice de Trombogenicidade

$$IT = \frac{(C14:0 + C16:0 + C18:0)}{(0,5 \times \Sigma AGMI) + (0,5 \times \Sigma n - 6) + (3 \times \Sigma n - 3) + \frac{(\Sigma n - 3)}{(\Sigma n - 6)}}$$

Onde:

C14:0: ácido mirístico;

C16:0: ácido palmítico;

C18:0: ácido esteárico;

Σ AGMI: soma das concentrações de todos os AG monoinsaturados;

Σ n-6: a soma das concentrações dos AG poli-insaturados ômega 6;

Σ n-3: soma das concentrações de poliinsaturados ômega 3;

Σ n-3/n-6: razão entre somatório de ômega 3 e somatório de ômega 6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EFEITO E INTERAÇÕES DAS CONCENTRAÇÕES DE DIFERENTES NUTRIENTES NA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Saccharomyces boulardii*

Os resultados da produção de biomassa de *S. boulardii* nas diferentes condições experimentais do planejamento fatorial 2⁽⁴⁻⁰⁾ estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados da produção de biomassa de *S. boulardii*

Experimento	Glicose (X1)	Sacarose (X2)	Ext. levedura (X3)	Sulfato de Amônio (X4)	Biomassa (g.L ⁻¹)
01	0,1g	0,1g	0,05g	0,05g	6,10
02	0,1g	0,1g	0,05g	0,15g	0,70
03	0,1g	0,1g	0,15g	0,05g	0,90
04	0,1g	0,1g	0,15g	0,15g	1,40
05	0,1g	0,5g	0,05g	0,05g	1,10
06	0,1g	0,5g	0,05g	0,15g	1,80
07	0,1g	0,5g	0,15g	0,05g	0,60
08	0,1g	0,5g	0,15g	0,15g	1,40
09	0,5g	0,1g	0,05g	0,05g	1,00
10	0,5g	0,1g	0,05g	0,15g	1,60
11	0,5g	0,1g	0,15g	0,05g	1,60
12	0,5g	0,1g	0,15g	0,15g	0,62
13	0,5g	0,5g	0,05g	0,05g	1,10
14	0,5g	0,5g	0,05g	0,15g	1,10
15	0,5g	0,5g	0,15g	0,05g	1,50
16	0,5g	0,5g	0,15g	0,15g	1,40

Fonte: Autoria própria (2018).

Os resultados obtidos neste estudo, levando em consideração as condições experimentais, mostraram que a produção de biomassa nos experimentos variou de 0,60 a 6,1 g.L⁻¹ de biomassa, ressaltando a aplicabilidade desta espécie em processos fermentativos para produção de biomassa. A condição que pareceu mais favorável para a produção de biomassa de *S. boulardii*, foi no experimento 01, que produziu 6,10 g.L⁻¹ de biomassa e a condição que pareceu menos favorável para a produção de biomassa de *S. boulardii*, foi no experimento 07, com 0,60 g.L⁻¹ de biomassa.

De acordo com os resultados observados na Tabela 3, a diferença entre os

experimentos 01 e 07 está representada pela modificação da concentração da sacarose e extrato de levedura. Desta forma, a diferença observada na resposta ($6,10\text{g} - 0,60\text{g} = 5,5 \text{ g.L}^{-1}$) indicou que a biomassa de *S. boulardii* aumentou quando a concentração de sacarose e extrato de levedura foi modificada do nível máximo ($0,5 \text{ g.100mL}^{-1}$ e $0,15 \text{ g.100mL}^{-1}$, respectivamente) para o nível mínimo ($0,1 \text{ g.100mL}^{-1}$ para e $0,05 \text{ g.100mL}^{-1}$ respectivamente). Resultado de produção de biomassa similar foi encontrado entre os experimentos 01 e 12, e está representada pela modificação da concentração da glicose, extrato de levedura e sulfato de amônio. A diferença observada na resposta foi a mesma ($6,10\text{g} - 0,62\text{g} = 5,48 \text{ g}$) onde a biomassa de *S. boulardii* aumentou quando a concentração de glicose, extrato de levedura e sulfato de amônio foram modificados do nível máximo para o nível mínimo.

Após análise estatística verificou-se que os parâmetros estudados e seus níveis de variação, não afetaram significativamente a produção de biomassa ($p \geq 0,05$). Na Tabela 4 observam-se as estimativas dos efeitos de cada variável, suas interações e a significância ($p \leq 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,8649, o que indica uma boa relação dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo matemático, ou seja, somente 13,51% da variação da produção de biomassa não pode ser explicado pelos fatores estudados, existindo outros fatores que poderiam ser importantes para conseguir uma produção de biomassa maior.

Observa-se que a produção de biomassa e outros produtos biotecnológicos de interesse podem ser influenciados pelas condições de cultivos, em particular do meio de cultura, tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio, bem como pH e temperatura de cultivo (BRAVO et al., 2000; BRAVO-MARTINS et al., 2009; BRAVO e CASTRO-GÓMEZ, 2010).

O efeito negativo das variáveis independentes e suas interações (observados na tabela 4) indicam que um aumento nas suas concentrações, provocaria uma diminuição da massa celular de *S. boulardii* (Figura 5) e uma diminuição das concentrações destes parâmetros dentro da faixa estudada, incrementaria a produção de biomassa. No entanto, os efeitos negativos das variáveis independentes e suas interações não foram significativos ($p \geq 0,05$).

Tabela 4 -Estimativas dos efeitos de cada variável, suas interações e significância ($p \leq 0,05$)

Variáveis e Interações	Efeitos	P
(X1) Glicose	-0,5125	0,6742
(X2) Sacarose	-0,4875	0,6876
(X3) Ext. de Levedura	-0,6375	0,6117
(X4) Sulfato de amônia	-0,4875	0,6876
X1 * X2* X3	-0,3125	0,7899
X1 * X2* X4	-0,7625	0,5568
X1 * X3* X4	-0,9625	0,4830
X2 * X3* X4	-0,5375	0,6611

Fonte: Autoria própria (2018).

Os resultados encontrados de produção de biomassa corroboram com os encontrados na literatura, na qual encontram-se entre 5,46 g.L⁻¹; 6,09 g.L⁻¹; 6,40 g.L⁻¹, 7,05 g.L⁻¹ de biomassa das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* e *Rhodotorula mucilaginosa*, respectivamente (CAZETTA e CELLIGOI, 2005; STRAPAZZON, 2015).

5.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Saccharomyces boulardii*

Os resultados da otimização da produção de biomassa de *S. boulardii* utilizando um delineamento central composto rotacional 2² (DCCR) estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 - Produção de biomassa de *S. boulardii*

Ensaio	Glicose (g.100 mL)	Sulfato de amônio (g.100 mL)	Biomassa (g.L ⁻¹)
1	10,00	0,10	4,41
2	10,00	0,30	4,50
3	30,00	0,10	11,96
4	30,00	0,30	12,74
5	5,86	0,20	4,06
6	34,14	0,20	15,60
7	20,00	0,06	8,47
8	20,00	0,34	9,64
9	20,00	0,20	7,61
10	20,00	0,20	9,20
11	20,00	0,20	9,50

Fonte: Autoria própria (2018).

Observa-se na Tabela 5, que a produção de biomassa de *S. boulardii* variou de

4,06 a 15,60 g.L⁻¹

O ensaio experimental que apresentou a melhor condição para a produção de biomassa de *S. boulardii* foi encontrado no ensaio 06 (15,60 g.L⁻¹), sendo o meio utilizado para seu crescimento constituído por 34,14% de glicose e 0,20% de sulfato de amônio. Por outro lado, o ensaio 05, constituído 5,86% de glicose e 0,20% de sulfato de amônio, apresentou uma condição desfavorável para produção de biomassa evidenciada pelo menor índice (4,06 g.L⁻¹)

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, a diferença entre o ensaio 06, com índice de biomassa de 15,60 g.L⁻¹ e o ensaio 05 com índice de biomassa de 4,06 g.L⁻¹ está representado pela modificação da concentração da variável (X₁), onde a glicose reduziu em 28,3%. A diferença observada na resposta (15,60 - 4,06 = 11,54 g.L⁻¹) indica que o índice de biomassa teve um ganho de 11,54 g.L⁻¹ quando a concentração de glicose variou do nível mínimo para o nível máximo.

Vale ressaltar que o coeficiente de determinação (R²) foi de 0,97011, o que indica uma excelente relação dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo matemático, ou seja, 97,01% da variação na produção de biomassa podem ser explicadas pelos fatores estudados e apenas 2,99% dessa variação não pode ser explicada pelos fatores estudados, existindo outros fatores que poderiam ser importantes para conseguir uma produção maior. Na Tabela 6 observam-se as estimativas dos efeitos de cada variável, suas interações e a significância (p≤0,05).

Tabela 6 -Estimativa dos efeitos de cada variável, suas interações e significância com p≤0,05 na produção de biomassa de *S. boulardii* em DCCR 2²

Variáveis	Estimativa dos Efeitos	P
Linear		
Glicose (X ₁)	0,395619	0,000055*
Sulfato de amônio (X ₂)	0,037073	0,289187
Quadrática		
Glicose (X ₁)	0,029883	0,458599
Sulfato de amônio (X ₂)	-0,008667	0,825154
Interação		
X ₁ *X ₂	0,005950	0,898248

Números seguidos de asterisco (*) são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança (p≤0,05).

Fonte: Autoria própria (2018).

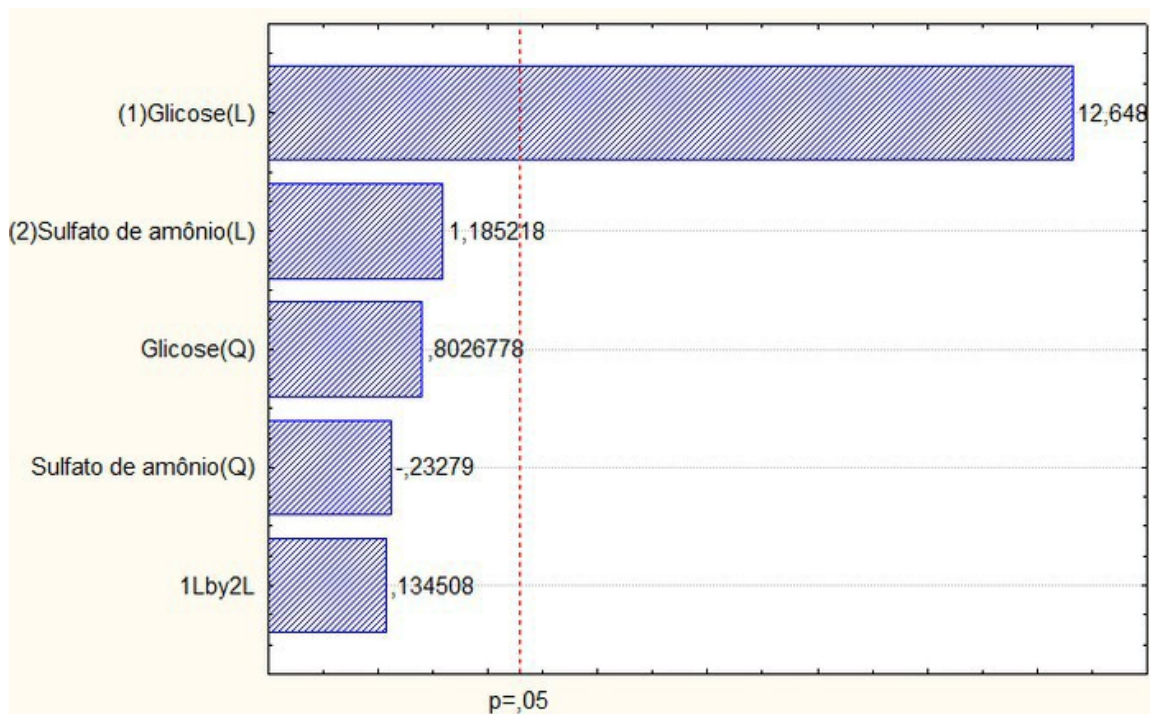
O efeito negativo do sulfato de amônio (X₂) indica que um aumento em sua concentração, provocaria uma diminuição da massa celular de *S. boulardii* e uma diminuição da concentração deste parâmetro dentro da faixa estudada, incrementaria

a produção de biomassa. No entanto, o efeito negativo desta variável independente não foi significativo ($p \geq 0,05$).

Na Figura 4, é apresentado o gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na produção de biomassa por *S. boulardii*. Todos os valores que se localizam à direita da linha tracejada, foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Analisando o gráfico de Pareto (Figura 4) e o gráfico de curvas de nível dos efeitos das variáveis independentes na produção de biomassa por *S. boulardii*, observa-se que a glicose foi a variável com efeito linear positivo mais relevante e estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) seguido do sulfato de amônio estatisticamente não significativo ($p \geq 0,05$). A glicose apresentou um efeito quadrático positivo mais relevante que o sulfato de amônio que apresentou efeito negativo, porém estatisticamente não significativo ($p \geq 0,05$). A interação entre sulfato de amônio e a glicose ($X1 \times X2$), apresentou efeito linear positivo menos relevante, mas estatisticamente não significativo ($p \geq 0,05$).

Figura 4 - Gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na produção de biomassa por *S. boulardii*.

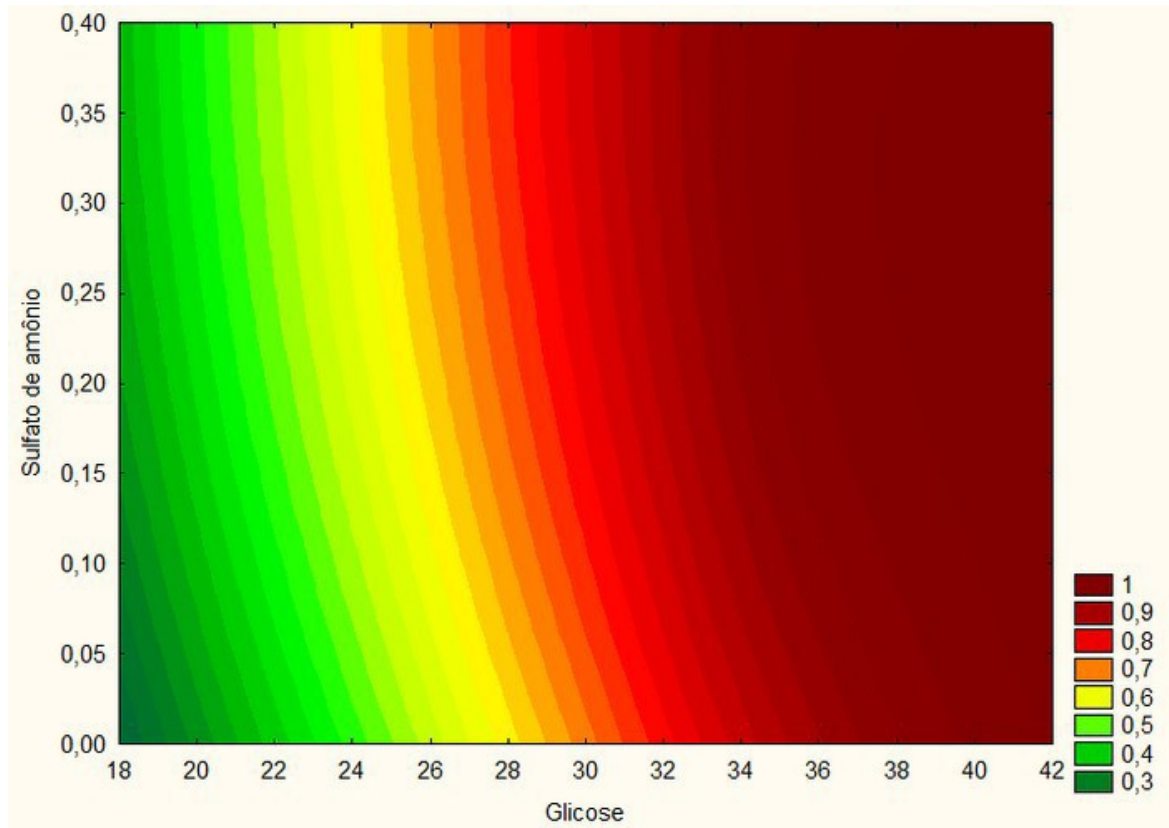


Fonte: A autora (2018).

Na produção de biomassa de levedura controlou-se a relação C:N, limitando a quantidade de nitrogênio, ou seja, fornecendo carbono em excesso (na forma de glicose). A limitação de nitrogênio teve por objetivo criar um ambiente favorável à

acumulação de lipídeos. Observa-se na Figura 5 que com uma relação C/N >1 garante-se que o nitrogênio seja totalmente consumido, enquanto que os outros nutrientes, incluindo o carbono, permaneçam em excesso no meio de cultivo (MEESTERS et al.,1996).

Figura 5 - Gráfico curvas de nível efeitos das variáveis independentes na produção de biomassa por *S. boulardii*.



Fonte: A autora (2018).

5.3 PORCENTAGEM DE LIPÍDEOS E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE *Saccharomyces cerevisiae* E *Saccharomyces boulardii*

A partir do método estabelecido por Bligh e Dyer (1959), obteve-se a porcentagem de lipídeos das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*.

Para cada uma das leveduras calculou-se a média e desvio padrão da porcentagem de lipídeos. Na Tabela 7 observa-se a porcentagem média e desvio padrão para cada levedura, além da qualificação lipídica e as razões entre os tipos de lipídeos.

Tabela 7- Quantificação lipídica e composição de ácidos graxos presente nas leveduras *Saccharomyces ssp.*

Parâmetros	Leveduras		
	<i>S. boulardii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>p</i> -valor
Lipídeos Totais (%)	0,55 ±0,06	0,12±0,05	0,021846
Ácidos Graxos (% área do pico)	Leveduras		
	<i>S. boulardii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>p</i> -valor
C12:0	0,44±0,01	nd	-
C14:0	1,23±0,01a	1,11±0,01b	0,003821
C16:0	16,35±0,08a	16,33±0,04a	0,373708
X1	0,70±0,01a	0,73±0,01a	0,057572
C16:1	34,70±0,15a	34,04±0,06b	0,008595
C17:1	0,35±0,15	nd	-
C18:0	6,65±0,02a	6,53±0,02b	0,019613
C18:1N-9T	0,31±0,01	nd	-
C18:1N-9C	33,13±0,05b	34,60±0,14a	0,004789
X2	1,26±0,01b	1,30±0,01a	0,011794
X3	0,34±0,01	nd	-
C18:2N-6C	0,53±0,02b	0,60±0,01a	0,006820
C20:3N-6	0,29±0,02	nd	-
C22:1N-9	1,96±0,02 ^a	2,61±0,02b	0,000744
C24:0	0,28±0,05b	0,59±0,05a	0,016074
C24:1	0,29±0,01	nd	-
C22:6N-3	1,18±0,04b	1,55±0,02a	0,007302
Somatórios			
AGS	24,95±0,06 ^a	24,56±0,08a	0,033815
AGMI	70,74±0,01b	71,26±0,11a	0,021506
AGPI	2,01±0,08b	2,15±0,02a	0,125393
N-9	35,40±0,02b	37,21±0,16a	0,004113
N-6	0,82±0,04 ^a	0,60±0,01b	0,015378
N-3	1,18±0,04b	1,55±0,02a	0,007302
X	2,30±0,01 ^a	2,03±0,01b	0,000583
Razões			
AGPI/AGS	0,08±0,003a	0,09±0,01 ^a	0,094763
AGMI/AGS	2,84±0,01b	2,90±0,01 ^a	0,027352
N-6/N-3	0,70±0,01a	0,39±0,01b	0,000542

X1, X2, X3 – Ácidos graxos não identificados; Nd: não detectado; AGS: Ácidos Graxos Saturados; AGMI: ácidos Graxos Monoinsaturados; AGPI: Ácidos Graxos Poliinsaturados; N-9: Ácidos graxos Ômega-9; N-6: ácidos Graxos ômega-6; N-3: ácidos Graxos ômega-3; AGPI/AGS: razão entre ácidos graxos poliinsaturados e saturados; AGMI/AGS: Razão entre ácidos graxos monoinsaturados e saturados; N-6/N-

3: Razão entre Ácidos Graxos Ômega 6 e Ômega 3. Os Resultados são médias dos valores em duplicata, acompanhados dos respectivos desvios padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste t.

Fonte: Autoria própria (2018).

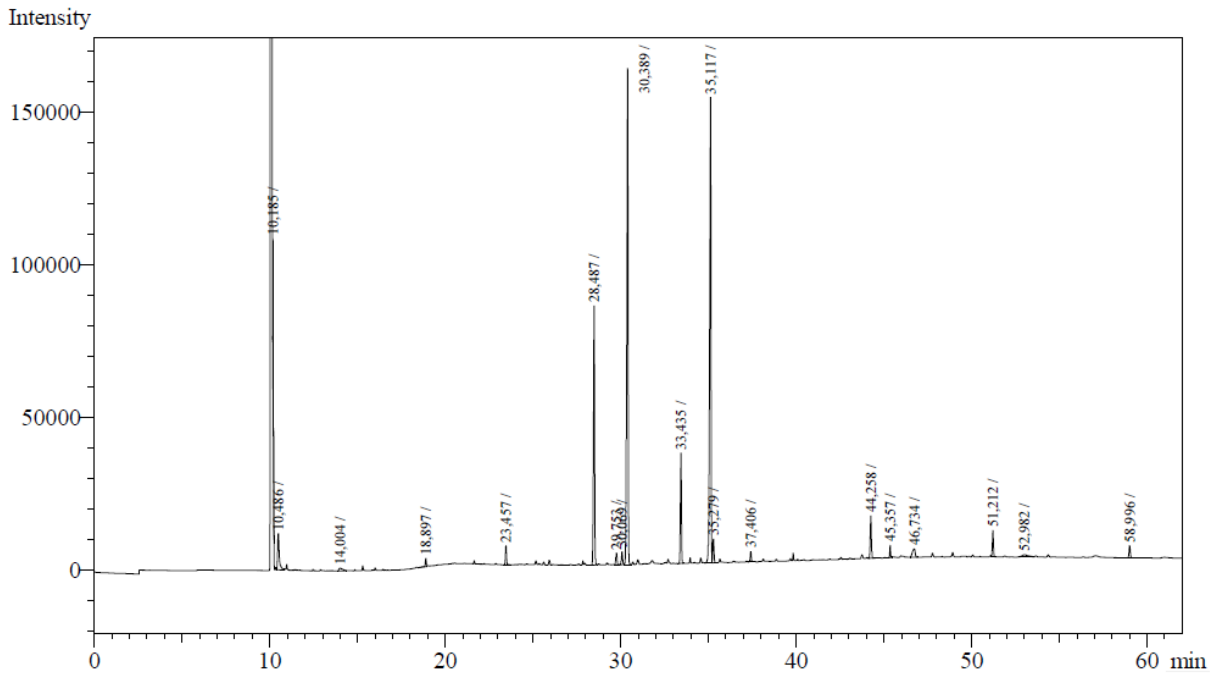
No perfil de ácidos graxos foram identificados 18 ácidos graxos para a levedura *S. boulardii*, dos quais 6 são saturados, 6 monoinsaturados e 3 poliinsaturados. Os ácidos graxos majoritários encontrados nas amostras *S. boulardii* foram os ácidos palmítico (C16:0), palmitoléico (C16:1), esteárico (C18:0), oléico (C18:1n9-C). Observou-se também, a predominância dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) seguido dos saturados (AGS) e poliinsaturados (AGPI). Sendo que para os ácidos graxos saturados (AGS) o maior percentual foi encontrado para o ácido palmítico (C16:0).

Dentre os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), os ácidos predominantes foram o ácido palmitoleico (C16:1) e oleico (18:1 n-9) apresentando percentual de 34,70 e 33,13 respectivamente. As amostras de levedura *S. boulardii* ainda apresentaram alta porcentagem de ômega 9 (n-9) com 34,06%, seguidos de 1,74 de ômega 3 (n-3) e 0,79 de ômega 6 (n-6). Além disso, observou-se a presença do ácido oleico tanto na forma trans, quanto na forma cis.

Para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram identificados 11 ácidos graxos, dos quais quatro são saturados, três monoinsaturados e dois poliinsaturados. Os ácidos graxos majoritários encontrados nas amostras *S. cerevisiae* foram os ácidos palmítico (C 16:0), pamitoleico (C 16:1), esteárico (18:0) e oleico (C18:1N9-C). Entre os ácidos graxos encontrados pode-se observar a predominância dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) com cerca de 71,26%, seguido dos ácidos graxos saturados (AGS) com 24,56%, 2,15% poliinsaturados (AGPI) e 2,03% de ácidos graxos não identificados (X). As amostras de levedura *S. cerevisiae* ainda apresentaram alta porcentagem de ômega 9 (n-9) com 37,21%, seguidos de 1,55% de ômega 3(n-3) e 0,60 de ômega 6 (n-6). Dos 24,56% de ácidos graxos saturados, cerca de 16,33% são oriundos do ácido palmítico. Os ácidos oléico e palmitoléico, apresentaram 34,60% e 34,04% respectivamente, totalizando 68,64% dos 71,26% de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) encontrados para tal levedura.

Na Figura 6 pode-se observar os picos referentes aos ácidos graxos encontrados via cromatografia gasosa para a levedura *S. cerevisiae*.

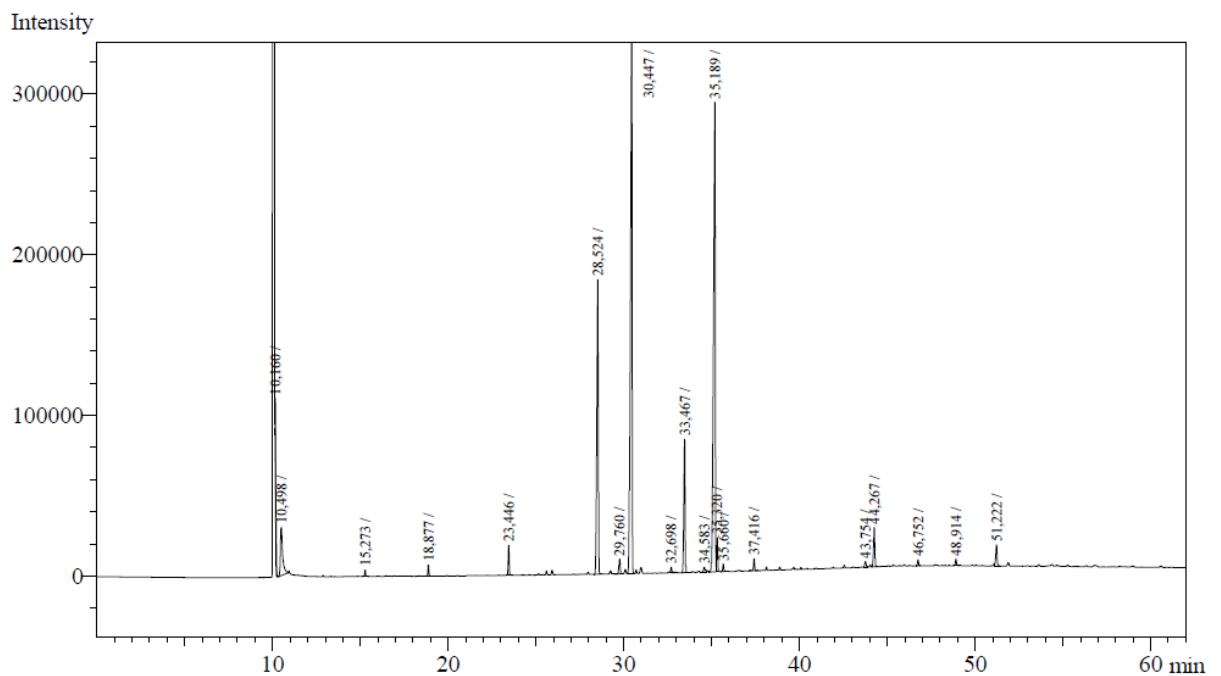
Figura 6 - Cromatograma da levedura *S. cerevisiae*.



Fonte: Autoria própria (2018).

Na Figura 7 observa-se os picos referentes a levedura *S. boulardii*, em tais picos observam-se os diferentes componentes, que possuem cada um, uma saída da coluna em um tempo diferente (tempo de retenção).

Figura 7 - Cromatograma da levedura *S. boulardii*



Fonte: Autoria própria (2018).

Os ácidos graxos das famílias ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6) apresentam

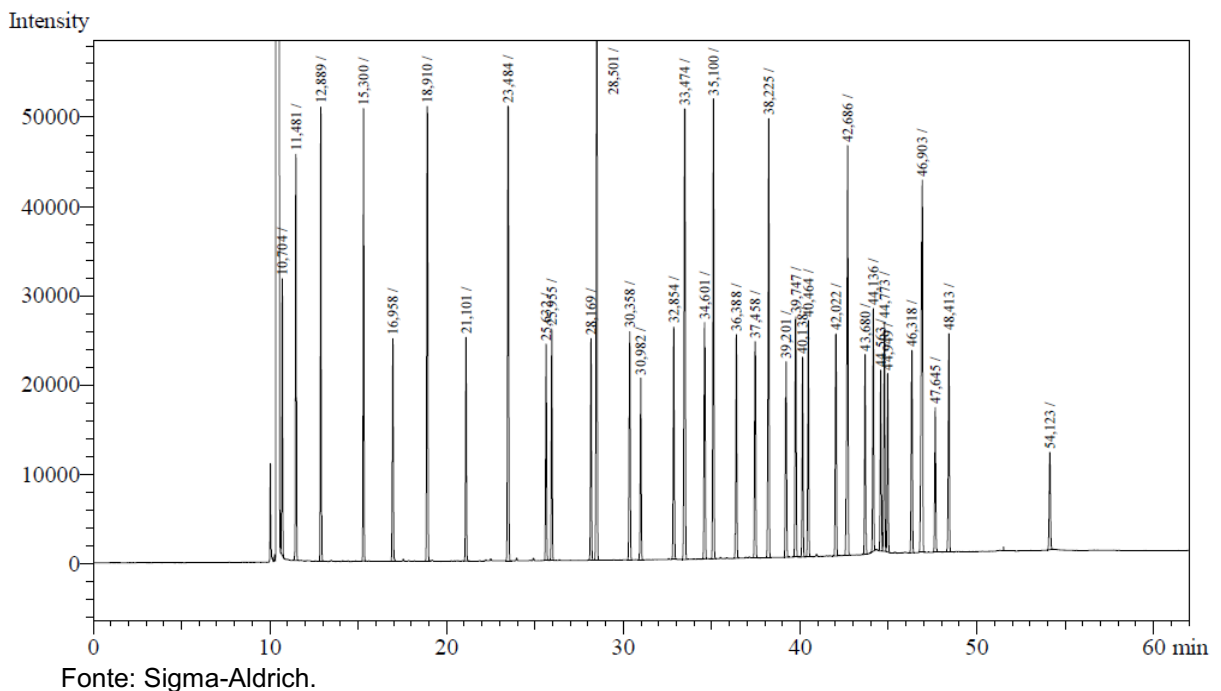
propriedades funcionais distintas e podem atuar simbioticamente, visando regular inúmeros processos fisiológicos humanos (TONIAL et al., 2010).

A razão n-6/n-3 é utilizada com frequência para analisar o teor nutricional de óleos e gorduras, e de acordo com o Departamento de Saúde da Inglaterra, valores inferiores a 4,0 são ideais. Nas leveduras analisadas, foram encontrados valores de 0,70 % para *S. boulardii* e 0,39 para *S. cerevisiae*, para razão n-6/n-3, portanto, pode-se dizer que o valor encontrado para ambas as leveduras, encontra-se dentro do recomendável, quando referido a saúde humana.

Outro ácido encontrado em ambas as leveduras foi o ADH (22:6n-3), ácido que possui importante função na formação, desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina, sendo predominante na maioria das membranas celulares de tais órgãos. A proporção encontrada nas leveduras variou de 1,18 à 1,55%.

Para realizar a identificação dos ácidos graxos encontrados nas amostras de leveduras *Saccharomyces spp.*, utilizou-se o Padrão Sigma-Aldrich, contendo 37 padrões de éster metílico de ácidos graxos, tal padrão pode ser observado na Figura 8, onde há a representação do cromatograma do padrão utilizado.

Figura 8 - Cromatograma do Padrão Sigma-Aldrich para ácidos graxos



Na Tabela 8 observa-se a comparação entre a obtenção de ácidos graxos de

outras leveduras e de três diferentes óleos vegetais, com as duas leveduras estudadas.

Tabela 8 - Resultados de produção de lipídeos por leveduras oleaginosas e composição dos ácidos graxos de algumas origens vegetais.

Ácidos Graxos (% área do pico)	Leveduras						Óleos vegetais		
	<i>S. boulardii</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>C. curvatus</i>	<i>L. starkeyi</i>	<i>R. toruloides</i>	<i>T. cutaneum</i>	Óleo de palma	Óleo de coco	Óleo de oliva
C12:0	0,44±0,01	nd	-	-	-	-	-	-	-
C14:0	1,23±0,01a	1,11±0,01b	-	0,7	1,3	-	0,85	19,7	0
C16:0	16,35±0,08a	16,33±0,04a	30,1	36,3	20,0	48,6	40,3	7,8	11,4
X1	0,70±0,01a	0,73±0,01a	-	-	-	-	-	-	-
C16:1	34,70±0,15a	34,04±0,06b	-	4,2	0,6	0,6	0,5	-	0,7
C17:1	0,35±0,15	Nd	-	-	-	-	-	-	-
C18:0	6,65±0,02a	6,53±0,02b	18,5	5,0	14,6	19,2	4,8	3,1	2,7
C18:1N-9T	0,31±0,01	Nd	-	-	-	-	-	-	-
C18:1N-9C	33,13±0,05b	34,60±0,14a	39,3	50,1	46,9	31,7	44,8	4,7	77,3
X2	1,26±0,01b	1,30±0,01a	-	-	-	-	-	-	-
X3	0,34±0,01	Nd	-	-	-	-	-	-	-
C18:2N-6C	0,53±0,02b	0,60±0,01a	8,3	3,7	13,1	0,0	8,0	1,9	2,7
C20:3N-6	0,29±0,02	Nd	-	-	-	-	-	-	-
C22:1N-9	1,96±0,02a	2,61±0,02b	-	-	-	-	-	-	-
C24:0	0,28±0,05b	0,59±0,05a	-	-	-	-	-	-	-
C24:1	0,29±0,01	Nd	-	-	-	-	-	-	-
C22:6N-3	1,18±0,04b	1,55±0,02a	-	-	-	-	-	-	-
Referências			Zhang et al (2011)	Lin et al (2011)	Lin et al (2007)	Hu et al (2011)	Cardoso Bejan et al (2014)	Hayatullin a et al (2012)	Stefanoud aki et al (1999)
	Este estudo	Este estudo	adaptado de Yang et al (2015)	adaptado de Yang et al (2015)	adaptado de Yang et al (2015)	adaptado de Yang et al (2015)	adaptado de Yang et al (2015)	adaptado de Yang et al (2015)	adaptado de Yang et al (2015)

Fonte: Autoria própria (2018).

Entre as principais considerações dessa comparação, está a capacidade das leveduras em assimilarem grande quantidade de ácidos graxos como já foi citado anteriormente, sendo que em alguns casos a qualidade lipídica se sobrepõe a qualidade dos óleos vegetais.

5.4 AVALIAÇÃO DOS ÍNDICES DA QUALIDADE NUTRICIONAL DOS LIPÍDEOS (IQN)

A composição de ácidos graxos, e as razões provenientes da mesma, permitem avaliar a qualidade nutricional da fração lipídica e, para tanto, calculou-se os índices de aterogenicidade (IA), trombogenicidade (IT):

Tabela 9 - Índices de qualidade nutricional da fração lipídica das leveduras *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae*

Índice	Leveduras	
	<i>S. boulardii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
IA	0,30	0,28
IT	0,60	0,56

IA: Índice de Aterogenicidade – $[(C12:0 + 4 \times C14:0 + C16:0) / (\Sigma AGMI + \Sigma n-6 + \Sigma n-3)]$

IT: Índice de Trombogenicidade – $[(C14:0 + C16:0 + C18:0) / (0,5 \times \Sigma n-6) + (3 \times \Sigma n-3) + (\Sigma n-3/\Sigma n-6)]$

Fonte: A autora (2018)

De acordo com Tonial et al. (2010), os IA e IT indicam o potencial de estímulo à agregação plaquetária, ou seja, quanto menores os valores de IA e IT, maior é a quantidade de AG antiaterogênicos presentes em determinado óleo, desta forma, maior é o potencial de prevenção ao aparecimento de doenças coronarianas.

Diante disso, pode-se constatar que os lipídeos extraídos das leveduras do gênero *Saccharomyces ssp.* possuem índices desejáveis.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados experimentais, as leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* apresentaram resultados diferentes à produção/acúmulo de lipídeos, sendo que a levedura *S. boulardii* apresentou 0,55% de lipídeos, enquanto que a levedura *S. cerevisiae* apresentou 0,11%.

Em termos qualitativos, o perfil de ácidos graxos que ambas as leveduras apresentam são consideradas adequadas para fins alimentares e para produção de biocombustíveis.

Bons resultados em índices de qualidade lipídica nutricional (IA e IT) foram encontrados em ambas leveduras, levando em consideração que quanto menor forem tais índices, melhores são os resultados, podendo desta forma ser utilizadas tanto para produção de biocombustíveis, como para ingestão humana.

Sugere-se para possíveis trabalhos futuros, testar se há diferença significativa no acúmulo de lipídeos para a levedura *S. cerevisiae* quando cultiva-se a mesma.

REFERÊNCIAS

ADAMS, D. J. **Fungal cell wall chitinases and glucanases.** *Microbiology*, v.150, 2029- 2035, 2004.

AGEITOS, J. M. et al. **Oily yeasts as oleaginous cell factories.** *Applied Microbiology and Biotechnology* v.90 1219-1227, 2011.

AKPINAR-BAYIZIT, A.; OZCAN, T.; YILMAZ-ERSAN, L.; BASOGLU, F. A **Research on whey as a renewable substrate for Single Cell Oil Production by *Saprolegnia diclina*.** *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, v.7, 2016.

AMARETTI, A.; RAIMONDI, S.; SALA, M.; RONCAGLIA, L.; LUCIA, M.; LEONARDI, A.; ROSSI, M. **Single cell oils of the cold-adapted oleaginous yeast *Rhodotorula glacialis* DBVPG 4785.** *Microbial Cell Factories*, 9:73, 2010.

ANDRÉ, A.; DIAMANTOPOULOU, P.; PHILIPPOUSSIS, A.; SARRIS, D.; KOMAITIS M.; PAPANIKOLAOU, S. **Biotechnological conversions of bio-diesel derived waste glycerol into added-value compounds by higher fungi: production of biomass, single cell oil and oxalic acid.** *Industrial Crops and Products*, 31, 407–416, 2010.

ANGERBAURER, C.; SIEBBENHOFER, M.; MITTELBACH, M.; GUEBITZ, G. M. **Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production.** *Bioresource Technology* 99, 3051–3056, 2008.

ANSCHAU, A.; XAVIER, M. C. A.; HERNALSTEENS, S.; FRANCO, T. T. **Effect of feeding strategies on lipid production by *Lipomyces starkeyi*.** *Bioresource Technology*, 157, 214–222, 2014.

ASSOCIAÇÃO MINEIRA DE DEFESA DO AMBIENTE. **Ciclo de vida da cerveja.** 2011. Disponível em: <http://www.amda.org.br/?string=interna-projetos&cod=29>. Acesso em: 13 maio 2017.

BAPTISTA, A.S. ***Saccharomyces cerevisiae* em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses.** 2001. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2001.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2001.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. **A rapid method of total lipid extraction and purification**. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, p. 911-917, 1959.

BRAR, K.K.; SARMA, A.K.; ASLAM, M.; POLIKARPOV, I.; CHADHA, B.S. **Potential of oleaginous yeast *Trichosporon sp.*, for conversion of sugarcane bagasse hydrolysate into biodiesel**. *Bioresource Tecnology*, 2017.

BRAVO, CLAUDIA E. C.; CARVALHO, ELIANA. P.; SCHWAN, ROSANE F.; CASTROGÓMEZ, RAUL J. H.; PILÓN, Lucimeire. **Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus***. *Ciência e Agrotecnologia (UFLA)*, v.24, p.103-136, 2000.

BRAVO, CLAUDIA E. C. & CASTRO-GÓMEZ, RAUL J. H. **Seleção de fontes de enxofre para produção de enzimas celulolíticas por fungos anaeróbios**. In: Anais da VI Semana De Biotecnologia-Universidade Estadual De Londrina, Londrina, 2010.

BRAVO-MARTINS, CLAUDIA E. C.; CASTRO-GÓMEZ, RAUL J. H.; SARROUH, BOUTROS F.; SILVA, SILVIO S. **Production of cellulolytic enzymes by anaerobic fungi cultivated in different conditions**. *International Journal of Food Engeneering*, v.5, p.1/14-13, 2009.

BRUN, A. A. S.; ARRUDA, L F.; D'ARCE, M. A. B. R. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal**. *Quimica Nova*, Vol. 32, No. 4, 849-854, 2009.

BURDON, K.L. **Fatty material in bacteria and fungi revealed by staining dried, fixed slide preparations**. *Journal Bacteriology*, 52: 665-678, 1946.

CARVALHO, A. P.; FERREIRA, R. L. **A utilização de biocombustíveis como alternativa sustentável na matriz energética brasileira**. *Caderno Meio Ambiente e Sustentabilidade* - v.5, n.3 – 2014.

CAZETTA, M.L. & CELLIGOI, M.A.P.C. **Aproveitamento do melão e vinhaça de cana-de-açúcar como substrato para produção de biomassa protéica e lipídica por leveduras e bactéria.** *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 26, n. 2, p. 105-112, jul./dez. 2005.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). UFRJ. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

COSTA, A. G., MAGNANI, M., CASTRO-GOMEZ, R. J. H. **Obtenção e caracterização de extrato contendo manoproteínas da parede celular de levedura descartada em cervejaria.** *Acta Scientiarum – Biological Science*, v 34, p 77-84, 2012.

COSTALOS, C., SKOUTERI, V., GOUNARIS, A., SEVASTIADOU, S., TRIANDAFILIDOU, A., EKONOMIDOU, C., KONTAXAKI, F., PETROCHILOU, V. **Enteral feeding of premature infants with *Saccharomyces boulardii*.** *Early Human Development*, v.74, p. 89-96, 2003.

DAUM, G., WAGNER, A., CZABANY, T., & ATHENSTAEDT, K. **Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast.** *Biochimie*, 89: 243-248, 2007.

DMITRUK, HILDA BEATRIZ (Org.). **Cadernos metodológicos: diretrizes da metodologia científica.** 5. ed. Chapecó: Argos, 123 p., 2001.

ENGEL, R. G.; KRIZ, G. S.; LAMPMAN, G. M.; PAIVA, D. L. *Química Orgânica Experimental.* Tradução da 3ª Edição, Cengage Learning, São Paulo, 2013.

EVANS, C.T., RATLEDGE, C., GILBERT, S.C. **A rapid screening method for lipid-accumulating yeast using a replica-printing technique.** *Journal of Microbiological Methods*, 4: 203-210, 1985.

FALSETTI, S. **Biocombustíveis: vantagens e desvantagens.** *Ciência, Unesp*, p.43, fev. 2010.

FAKAS, S.; PAPANIKOLAOU, S.; BATSOS, A.; PANAYOTOU, M. G.; MALLOUCHOS, A; AGGELIS, G. **Evaluating renewable carbon sources as substrates for single cell oil production by *Cunninghamella echinulata* and *Mortierella isabellina*.** *Biomass and bioenergy*, 33, 573 – 580, 2009.

FARIAS, L. M.; SELBITTO, M. A. **Uso da energia ao longo da história: evolução e perspectivas futuras.** *Revista Liberato*. Novo Hamburgo, v. 12, n. 17, p. 01-106, 2011.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S.; J. **A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.** *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509, 1957.

GALVEZ, F.C.F.; RESURRECION, A.V.A.; KOEHLER, P.E. **Optimization of processing of peanut beverage.** *Sensory Studies* 5, 1-18, 1990.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, Sétima Edição, Itc (Livros Técnicos e Científicos Editora Ltda), Rio de Janeiro, (Tradução de 7th ed Quantitative Chemical Analysis), 2008.

HUANG, C.; CHEN, X.; XIONG, L.; MA, L.; CHEN, Y. **Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization.** *Biotechnology Advances*. v.31, p.129–139, 2013.

HUNG, N.T., HERVE, M. **Saccharomyces boulardii fermentations.** *Trends in Food Science & Technology*, v.6, n.9, 1995.

ISO – International Organization for Standardization. Geneve: Method ISO 5509, p.1- 6, 1978.

KATRE, G.; JOSHI, C.; KHOT, M.; ZINJARDEI, S.; KUMAR, A. R. **Evaluation of single cell oil (SCO) from a tropical marine yeast *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 as a potential feedstock for biodiesel.** *AMB Express*, 2:36, 2012.

LAMSAL, B.P.; PATHIRAPONG, P.; RAKSHIT, S. **Microbial growth and modification of corn distillers dried grains with soluble during fermentation.** *Industrial Crops and Products*, v. 37, p. 553-559, 2012.

LEITE, R. C. de C., LEAL, M. R. L. V. **O biocombustível no Brasil.** *Novos Estudos CEBRAP*, v. 78, p. 15-21, 2007.

MARTINS, F.S.; BARBOSA, F.H.C.; NICOLI, J.R., **O probiótico *Saccharomyces boulardii*.** *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.9, n.2, p. 171-182, 2009.

MATANNA P., ROSA, P.D., POLI, J. S., RICHARDS, N. S. P. S., DABOIT, T. C., SCROFERNEKER, M. L., PASTORE, A. P. W., CORCAO, G., BERTOLDI, F. C., DESCHAMPS, F. C., & VALENTE, P. 2014. **Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese.** *Revista Brasileira de Biociência*, 12: 121-126, 2014.

MATEUS, N. B.; BARBIN, D.; CONAGIN, A. **Viabilidade de uso do delineamento composto central.** *Acta Scientiarum Maringá*, v. 23, n. 6, p. 1537-1546, 2001.

MEESTERS, P. A. E. P.; HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G. **High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source.** *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, p. 575-579, 1996.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. **Biodiesel production from oleaginous microorganisms.** *Renewable Energy*, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA E PETROBRAS. **Biocombustíveis: 50 perguntas e respostas sobre este novo mercado**, 2007.

MULLER, J. L.; PROTTI, K. L.; MACHADO, M. S.; LACERDA, L. L. V, BRESOLIN T. M.; PODLECH, P. S. **Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador por batelada tipo air lift e shaker.** *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 27 (4): 688-693, 2007

PAPANIKOLAOU, S.; RONTOU, M.; BELKA, A.; ATHENAKI, M.; GARDELI, C.; MALLOUCHOS, A.; KALANTZI, O.; KOUTINAS, A. A.; KOOKOS, J. K.; ZENG, A.P.; AGGELIS, G. **Conversion of biodiesel-derived glycerol into biotechnological products of industrial significance by yeast and fungal strains.** *Engineering in Life Sciences*, 00, 1–20, 2016.

PAVLOVA, K.; PANCHEV, I.; HRISTOZOVA, Ts. **Physico – chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 21, 279–283, 2005.

PINOS-RODRÍGUEZ, J.M., ROBINSON, P.H., ORTEGA, M.E., BERR, S.L., MENDOZA, G. **Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Saccharomyces cerevisiae* 1077 or *Saccharomyces boulardii* 1079.** *Animal Food Science and Technology*, v. 140, p. 223-232, 2009.

POLI, J.S., DALLÉ, P., SENTER, L. MENDES, S. RAMIREZ, M., VAINSTEIN, M.H. & VALENTE, P. **Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils.** *Revista Brasileira de Biociência*, 11(2): 203-208, 2013.

POLI, J.S., LÜTZHØFT, H.H., KARAKASHEV, D.B., VALENTE, P. & ANGELIDAKI, I. **An environmentally - friendly fluorescent method for quantification of lipid contents in yeast.** *Bioresource Technology*, 51: 388-39, 2014.

PROBST, K.V.; VADLANI, P. V. **Single cell oil production by *Lipomyces starkeyi*: Biphase fed-batch fermentation strategy providing glucose for growth and xylose for oil production.** *Biochemical Engineering Journal* v.121, p. 49-58, 2017.

RATLEDGE C. **Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for single cell oil production.** *Biochimie*, 86:807–815, 2004.

SELVAKUMAR, P.; SIVASHANMUGAM P. **Thermo-chemo-sonic pre-digestion of waste activated sludge for yeast cultivation to extract lipids for biodiesel production.** *Journal of Environmental Management*, n.198, 90 - 98, 2017.

SHEN, Q.; CHEN, Y.; JIN, D.; LIN, H.; WANG, Q.; ZHAO, Y. **Comparative genome analysis of the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans* reveals its potential applications in lipid accumulation.** *Microbiological Research* n.192, 203–210, 2016.

SILVA, L. P. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. **Tecnologias de Produção de Biodiesel.** *Revista. Virtual de Química*, 3 (5), 385-405, 2011.

SCENI, P.; PALAZOLO, G. G.; VASALLO, M. C.; PUPPO, M. C.; OTERO, M. A.; WAGNER, J. R. **Thermal and surface behavior of yeast proteins fractions from *Saccharomyces cerevisiae*.** *LTW – Food Science and Technology*, v.42, p. 1098-1106, 2009.

SGARBIERI, V. C., ALVIM, I. D., VILELA, E. S. D., BALDINI, V. L. S., BRAGANOLO, N. **Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces ssp.*) para uso como ingrediente na formulação de alimentos.** *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 2, n.1,2, p. 119-125, 1999.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. **Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica.** *Química Nova*, Vol. 30, No. 8, 2068-2071, 2007.

STRAPAZZON, R. **Determinação das condições ideais para produção de biossurfactante por *Kluyveromyces marxianus*.** 42 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Francisco Beltrão, 2015.

TASKIN, M.; ORTUCU, S.; AYDOGAN, M. N.; ARSLAN, N. P. **Lipid production from sugar beet molasses under non-aseptic culture conditions using the oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* TR29.** *Renewable Energy*, n.99, 198-204, 2016.

THAKUR M. S., PRAPULLA S. G., KARANTH N. G. **Estimation of intrace Hular lipids by the measurement of absorbance of yeast cells stained with Sudan Black B.** *Enzyme and Microbial. Technology*, vol. 11, 1988.

THLIVEROS, P.; KIRAN, E. U.; WEBB, C. **Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass.** *Bioresource Technology*, 157, 181–187, 2014.

TONIAL, I. B.; OLIVEIRA, D. F.; BRAVO, C. E. C.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. **Caracterização físico-química e perfil lipídico do salmão (*Salmo salar* L.).** *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v. 21, n.1, p. 93- 98, 2010.

TURAN, H.; SÖNMEZ, G.; KAYA, Y. **Fatty acid profile and proximate composition of the thornback ray (*Raja clavata*, L. 1758) from the Sinop coast in the Black Sea.** *Journal of Fish Science*, v. 1, n. 2, p. 97-103, 2007.

ULBRICHT, T. L. V.; SOUTHGATE, D. A. T. **Coronary heart disease: seven dietary factors.** *The Lancet*, v. 338, n. 8773, p. 985-992, 1991.

ULHOA, S. A. **Produção de Biocombustíveis: um panorama sobre o discurso ambiental e econômico.** *Acervo da Iniciação Científica*, n. 2. 2013.

URQUIAGA S.; ALVES, J. R.; BOODEY, R. M. **Produção de biocombustíveis: A questão do balanço energético.** *Revista da política agrícola*, Ano XIV - Nº 1, 2005.

VASUDEVAN, P. T., & BRIGGS, M. **Biodiesel production--current state of the art and challenges.** *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35: 421- 30, 2008.

VIEGAS, C. V. **Extração e caracterização dos lipídeos da microalga *Chlorella pyrenoidosa* visando a produção de ésteres graxos.** Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Rio Grande, 2010.

WILLIS R. M., MCCURDY A. T, OGBORN M. K, WAHLEN B. D, QUINN J. C, PEASE III L. F, SEEFELDT L. C. **Improving energetics of triacylglyceride extraction from wet oleaginous microbes.** *Bioresource Technology*. 167:416–424, 2014.

YAMADA, E.A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. **Composição centesimal e valor protéico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados.** *Revista Nutrição* [online], vol.16, n.4, pp.423-432, 2003.

YANG, X.; JIN, G.; WANG, Y.; SHEN, H.; ZHAO, Z. K. **Lipid production on free fatty acids by oleaginous yeasts under non-growth conditions.** *Bioresource Technology*, 193, 557–562, 2015.

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H. **Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, n. 6, p. 950-956, Jun 2008.

ZHAO, X.; KONG, X. L.; HUA, Y. Y.; FENG, B.; ZHAO, Z. B. **Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*.** *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 110, n. 5, p. 405-412, 2008.

ZECHNER-KRPAN, V.; PETRAVIC-TOMINAC, V.; GOSPODARI, I.; SAJLI, L.; DAKOVIC, S.; FILIPOVIC-GRCIC, J. **Characterization of B-Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods.** *Biotechnology*, v.48, n. 2, p. 189-197, 2010.